

## 新型石蜡包埋组织DNA 提取试剂盒

## (磁珠法)

AT3011-01/02 使用说明

## 产品简介

本试剂盒采用安全无毒的环保脱蜡试剂去除石蜡，应用特殊的裂解条件将石蜡组织中的 DNA 释放出来，再配合使用对 DNA 具有超强亲和力的经过特殊包埋的顺磁性磁珠，最终达到快速分离纯化 DNA 的目的。

整个提取过程不涉及有毒有害试剂，安全、便捷，提取的基因组 DNA 纯度高，质量稳定可靠，尤其适合高通量工作站的自动化提取。使用本试剂盒提取的 FFPE DNA 可适用于多种下游应用，如 PCR、NGS 捕获测序、Real-time PCR、SNP 基因分析 STR 基因分析、药物基因组学研究等。

## 试剂盒组成

| 产品成分     | AT3011-01<br>(50 次) | AT3011-01<br>(200 次) | 保存条件 |
|----------|---------------------|----------------------|------|
| 缓冲液 TA   | 50 mL               | 200 mL               | 室温   |
| 缓冲液 TL   | 10 mL               | 40 mL                | 室温   |
| 蛋白酶 K    | 1 mL                | 4 mL                 | 室温   |
| 缓冲液 TB   | 10 mL               | 40 mL                | 室温   |
| 磁珠 TH    | 1 mL                | 4 mL                 | 室温   |
| 缓冲液 TW1  | 19mL                | 76 mL                | 室温   |
| 缓冲液 TW2  | 20mL                | 80 mL                | 室温   |
| 洗脱缓冲液 TE | 5 mL                | 20 mL                | 室温   |

## 注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成。
2. 操作过程请注意避免样本之间的交叉污染。
3. 请使用 DNase/RNase-Free 的枪头、EP 管进行试验。
4. 初次使用时，**请按照缓冲液 TW1，TW2 试剂瓶标签上的指示，加入无水乙醇，并做好标记；**
5. 若缓冲液 TL、TB 中有沉淀，可在 55℃水浴重新溶解，摇匀后使用；
6. **实验所用磁珠应提前涡旋混合均匀再吸取相应的体积；**
7. 本产品所提 DNA 的完整性依赖于样本类型、储存时间以及固定条件。如果样本存放时间过久（>1 年）则易导致 DNA 完整性受损，无法扩出长片段。

## 需自备试剂和耗材

无水乙醇，DNase/RNase-Free H<sub>2</sub>O，RNase A（100mg/ml）  
各类移液吸头；1.5mL 离心管；磁力架；

## 操作步骤

**第一次使用前，应按照试剂瓶标签在 TW1, TW2 中加入无水乙醇并充分摇匀；所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心；实验开始前请提前设置 56°C 和 90°C 预热水浴锅或恒温金属浴。**

### 1. 样本处理

- 石蜡涂片：刮取石蜡涂片 5~10 张。
- 石蜡切片：取石蜡切片 (5-10  $\mu\text{m}$  厚,  $1\times 1\text{ cm}^2$  大小) 2-5 张。
- 石蜡块：手术刀刮取约 30 mg 的组织样本 (尽量去除多余的石蜡)。

**注意：如果样品表面暴露于空气中，最初刮取的 2-3 片弃掉不用。**

- 福尔马林等固定液中的样本：取 30 mg 样本，用手术刀切为数块，置于 1.5 ml 无菌离心管中，加入 500  $\mu\text{l}$  PBS (10 mM, pH7.4) 涡旋振荡混匀 12,000 rpm (~13,400 $\times g$ ) 室温离心 1 min, 重复 3 次。

### 2. 本试剂盒默认无毒脱蜡方案并提供无毒脱蜡液，客户亦可根据偏好选取二甲苯脱蜡，须自备二甲苯。二甲苯脱蜡方案详细步骤见说明书附 1。

将石蜡切片或石蜡块样本装于 1.5ml 无菌 1.5ml 离心管中，加入 1ml 缓冲液 TA，剧烈涡旋 1min，短暂离心后 56°C 孵育 10min。

### 3. 全速离心 2min，彻底移除上清。**注意：不要倒掉沉淀。**

### 4. 加入 200 $\mu\text{l}$ 缓冲液 TL，20 $\mu\text{l}$ 蛋白酶 K，充分混匀，56°C 孵育 1h，期间颠倒混匀 3 次。

### 5. 将上一步骤产物置于金属浴 90°C 孵育 1h。

### 6. (可选步骤) 如果要去除 RNA，可以将样品中加入 2 $\mu\text{l}$ RNase A (100 mg/ml, 客户自备)，室温孵 2 min 后，进行下一步操作。

### 7. 上一步骤产物若无固体残留，可直接进入步骤 8；

若上一步产物中仍残留不溶碎片，可在 12,000 rpm (~13,400 $\times g$ ) 室温离心 5 min，小心转移上清到新的 1.5ml 无菌离心管中进入步骤 8；

### 8. 手动提取可继续按该步骤向下操作，机器提取请参考说明书附 2。

加入 200  $\mu\text{l}$  缓冲液 TB，200  $\mu\text{l}$  无水乙醇，充分混匀室温静置 1min。

### 9. 加入 20 $\mu\text{l}$ 磁珠 TH，充分涡旋或吹打混匀，室温孵育 10min，孵育期间需颠倒混匀数次，避免磁珠沉底，低速离心。

### 10. 将混合液放置磁力架上吸附至液体澄清，移除上清。

### 11. 加入 600 $\mu\text{l}$ 缓冲液 TW1 (请确认是否已添加无水乙醇)，吹打混匀，低速离心后，放置磁力架上吸附至液体澄清，移除上清。

### 12. 加入 700 $\mu\text{l}$ 缓冲液 TW2 (请确认是否已添加无水乙醇)，颠倒混匀，低速离心后，磁力架上吸附至液体澄清，移除上清。

**注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应，所以晾干时要确保乙醇挥发干净，但也不要过分干燥，以免难以洗脱 DNA。**

15. 将管子从磁力架上取下，加入常温或预热至 55℃~65℃的缓冲液 TE 或无核酶水 50ul ~100ul 吹打混匀或振荡混匀，孵育 5min。
16. 将管子置于磁力架上 5min，待磁珠完全吸附时小心将 DNA 溶液转移至新的 1.5mL 无菌离心管中，样本可放置于-20℃长期保存。

**注意：洗脱缓冲液体积不应少于 50  $\mu$ l，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 对于洗脱效率有很大影响。**

**若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。**

A1. 将步骤 1 中的石蜡切片或石蜡块样本装于 1.5ml 无菌离心管中，加入 1ml 二甲苯，剧烈涡旋 1min。

A2. 全速离心 2min，弃上清。**注意：不要碰到沉淀。**

A3. 向上述管中加入 1ml 无水乙醇，涡旋混匀 1min。

A4. 全速离心 2min，弃上清。重复步骤 4 一次。**注意：不要碰到沉淀。**

A5. 将沉淀放入 56°C 干燥 5min，充分挥发乙醇。

A6. 按步骤 4-14 进行操作。

## 附 2：机器提取操作参考说明（以天隆提取仪为例）：

A1. 将说明书步骤 7 的 200μl 消化液转移至 2/8 孔。

A2. 按下方参考准备预制试剂板：

| 孔位 | 1、7                      | 2、8                     | 3、9          | 4、10         | 5、11         | 6、12                   |
|----|--------------------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|
| 试剂 | 500μl TW2, 20μl TH<br>磁珠 | 200μl TB, 200μl<br>无水乙醇 | 600μl<br>TW1 | 700μl<br>TW2 | 700μl<br>TW2 | 80μl Elution<br>Buffer |

A3. 按下方参考设置参数：

| 步骤 | 孔位 | 干燥   | 混合    | 速度 | 吸磁  | 体积  | 温度   |
|----|----|------|-------|----|-----|-----|------|
| 1  | 1  | 0    | 1 分钟  | 快  | 60s | 520 | 关闭   |
| 2  | 2  | 0    | 10 分钟 | 快  | 90s | 600 | 关闭   |
| 3  | 3  | 0    | 1 分钟  | 快  | 60s | 600 | 关闭   |
| 4  | 4  | 0    | 1 分钟  | 快  | 60s | 700 | 关闭   |
| 5  | 5  | 0    | 1 分钟  | 快  | 60s | 700 | 关闭   |
| 6  | 6  | 5 分钟 | 8 分钟  | 快  | 90s | 80  | 55°C |
| 7  | 1  | 0    | 1 分钟  | 快  | 0   | 520 | 关闭   |

A4. 将磁棒套插入仪器，关闭仪器门，选择相应程序，点击开始，点击继续，仪器开始自动提取。

A5. 运行时间约 30min，提取完成后，把第 6/12 排孔中的 DNA 转至 1.5ml 离心管中保存，丢去磁力外套和深孔板。

**Q1：磁珠结团**

A1：脱蜡液去除不彻底

A2：石蜡样本未完全消化，且未离心将残留物去除干净

**Q2：DNA 产量低或纯度不达标**

A1：样品用量太多：起始量与 DNA 分离的组织类型、大小和数量均有关系，建议的组织厚度为 5-10  $\mu\text{m}$ 。所用的切片数量取决于组织类型（决定细胞密度）和表面积大小（推荐大小：50-200  $\text{mm}^2$ ）。建议减少样品用量，石蜡组织切片不要超过 5~10 片。

A2：脱蜡不充分：切片过厚或包埋时使用过量石蜡。建议 1) 室温下重复用二甲苯或无毒脱蜡液脱蜡，以彻底去除石蜡。2) 必要情况下，可在更为强效的 37-55°C 条件下处理达 30 分钟。3) 在二甲苯脱蜡操作完成后，须对沉淀物进行两次 100%乙醇漂洗再彻底去除 100%乙醇。

A3：样品消化不充分：把组织块尽量切成小碎片或切片。延长 56°C 温浴时间，最长可过夜孵育。

A4：解交联不充分：延长 90°C 温浴时间至 90~120 分钟。

A5：缓冲液 TW1/TW2 没有加入乙醇稀释。

A6：洗脱不充分：洗脱液提前预热，洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。

A7：Proteinase K 活性下降：使用保质期内的蛋白酶 K，超过保质期请更换试剂。

**Q3：RNA 残留**

A：加入 RNASE 处理：90°C 去交联后，加入 2~5  $\mu\text{l}$  RNase A 至消化液中，混匀后室温放置 15 分钟。

**Q4：是否可以通过缩短孵育时间加快实验速度**

A：可以，我们的试剂可以匹配快速操作方案，DNA 得率较标准法会有所降低，但可以满足大多数的实验需求。参考条件为：56°C 裂解时间最低可以调整至 30min，90°C 复性时间最低可以调整至 30min，其余条件均不改变。

对于质量差的石蜡切片样本或者下游实验对得率要求较为严苛的情况，我们强烈推荐标准说明书进行 DNA 提取，以获得满意的实验结果。

**生产备案凭证编号：浙杭食药监械生产备 20200127 号**

**【医疗器械备案凭证编号/产品技术要求编号】：浙杭械备 20200945 号**

**【说明书批准及修改日期】：2020 年 09 月 02 日**